

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-521631
(P2001-521631A)

(43) 公表日 平成13年11月6日 (2001.11.6)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/48		G 0 1 N 33/48	M
27/447			P
33/48		33/53	Y
33/53		33/574	D
33/574		27/26	3 1 5 H
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-545232
(86) (22) 出願日 平成10年3月23日 (1998.3.23)
(85) 翻訳文提出日 平成11年9月21日 (1999.9.21)
(86) 国際出願番号 P C T / G B 9 8 / 0 0 8 8 1
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 4 3 0 9 1
(87) 国際公開日 平成10年10月1日 (1998.10.1)
(31) 優先権主張番号 9 7 0 5 9 4 9 . 7
(32) 優先日 平成9年3月21日 (1997.3.21)
(33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 プロテオム サイエンシーズ ビーエルシー
イギリス国 ケイティール 3 イービー
シュレイ, コプハム, ダウンサイド プリ
ッジ ロード, コプハム ハウス (番地な
し)
(72) 発明者 ホッホストラッサー, デニス フランコイ
ス
スイス国 シーエイチ-1245 コロンジー
ベルリブ, シェミン デ ラ サボニエレ
27
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 上皮細胞異常性の診断

(57) 【要約】

固形上皮腫瘍または他の異常性 (例えば、直腸結腸炎) の診断の方法であって、この方法は、上皮細胞から間質をサイズ分離する工程、依然として存在するほとんどの他の組織から、上皮細胞に特異的なモノクローナル抗体と該組織とを反応させることによって上皮細胞を分離する工程、抗体に結合した反応細胞を採集し、そして抗体からそれらを放出させることによって上皮細胞を分離する工程であって、それにより該サンプルが、サンプルの全組織の体積で少なくとも90%の上皮細胞を含む、工程、およびサンプルの少なくとも1つの表現型または遺伝子型の特徴を対応する正常上皮細胞と比較する工程を包含する。

結腸直腸上皮癌尾コ-D PAGE
参照マップ

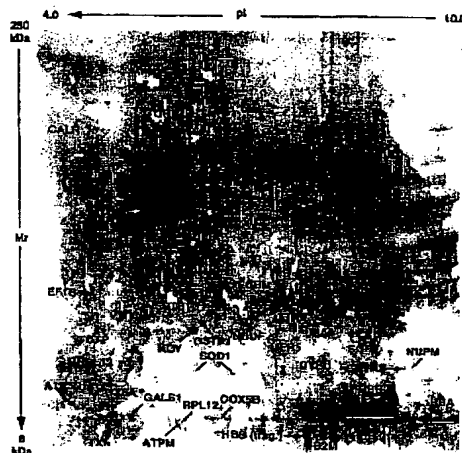


Fig 1

【特許請求の範囲】

1. 上皮細胞異常性を、疑わしい該異常性の位置から採取した組織のサンプルにおいて診断する方法であって、上皮細胞から間質をサイズ分離する工程、依然として存在するほとんどの他の組織から、上皮細胞に特異的なモノクローナル抗体と該組織とを反応させることによって上皮細胞を分離する工程、該抗体に結合した反応細胞を採集し、そして該抗体からそれらを放出させることによって上皮細胞を分離する工程であって、それにより該サンプルが、該サンプルの全組織の体積で少なくとも90%の上皮細胞を含む、工程、および該サンプルの少なくとも1つの表現型または遺伝子型の特徴を対応する正常上皮細胞と比較する工程を包含する、方法。
2. 請求項1に記載の方法であって、ここで前記サイズ分離が、約 $300\mu\text{m}$ のフィルターを通して組織サンプルをろ過する工程および該フィルターを通過する上皮細胞を採集する工程によって行われる、方法。
3. 前記サイズ分離が $150\sim 250\mu\text{m}$ のフィルターを通して上皮細胞をろ過する工程および該フィルターを通過する上皮細胞を採集する工程をさらに含む、請求項2に記載の方法。
4. 請求項1、2、または3に記載の方法であって、ここで表現型特徴が、少なくとも1つのタンパク質が前記正常細胞におけるよりも前記サンプルにおいてより高い濃度または低い濃度で存在するかを決定することによって比較される、方法。
5. 請求項4に記載の方法であって、ここで前記タンパク質が、前記正常細胞からよりも前記サンプルから抽出されるタンパク質の二次元電気泳動ゲルにおいてより多い量または少ない量で存在するタンパク質の中から選択される、方法。
6. 請求項5に記載の方法であって、ここで前記二次元電気泳動ゲルが、
 - (1) 5分間室温で10,000Gにて $1000\mu\text{l}$ のタンパク質抽出物を遠心分離して、ペレットを形成し、8M尿素、40%CHAPS、40mM Tris、65mMジチオエリスリトールおよび微量のプロモフェノールブルーを含む $300\mu\text{l}$ の溶液中に該ペレットを溶解し、そして生じるサンプル溶液を、非線形の、S字型(S型)pH勾配を有する固

定化pH勾配(IPG)ポリアクリルアミドゲルの3mm幅×180mm長の小片へロードする工程；

(2) 8 M尿素、2 % w/v CHAPS、10mMジチオエリスリトールおよびpH3.5~10の2% w/v緩衝液ならびに微量のプロモフェノールブルーの25mlの水溶液で一晩該ゲルを再水和する工程；

(3) 一次元電気泳動のためのIPGゲル小片上へ該サンプル溶液をロードし、そして3時間300から3500Vへ線形に増加される電圧で、次いでさらに3時間3500Vで、そして最後に17時間5000Vで電気泳動する工程；

(4) 50mM Tris-HCl、pH6.8、6 M尿素、30% w/vグリセロール、2 % w/v SDS、2.5% v/vヨードアセトアミドおよび微量のプロモフェノールブルーを含むの100mlの水溶液で5分間IPGゲル小片を処理し、タンパク質を可溶化し、そしていずれの-S-S結合をも還元する、工程；

(5) 9~16%のアクリルアミドモノマー、2.6%のジアクリロイルピペラジン架橋剤、5mMチオ硫酸ナトリウム、0.05%テトラメチルエチレンジアミン、0.1%過硫酸アンモニウムおよび0.375M Tris-HCl緩衝液(pH8.8) (すべてのパーセントはw/vである) を含む水溶液からポリアクリルアミド勾配スラブゲル160×200×1.5mmを調製し、2時間第2級ブタノールで重層し、水とブタノールを交換しそして15時間静置し、0.5%アガロース、pH8.3のTris-グリシン-SDS、25mM Tris、198mMグリシンおよび0.1%SDSを含む、70℃まで加熱した水溶液でスラブゲルを重層し、そして第二の次元電気泳動のためにその上にIPGゲル小片をロードする工程；

(6) 一定の40mA/ゲルでおよび5時間10℃で第二の次元の電気泳動を行う工程；そして

(7) ゲルを銀染色し、そしてレーザーデンシトメーターでそれらをスキャンし、

該染色されたゲルのコンピューター生成画像を提供する工程、によって得られる、方法。

7. 請求項1、2または3に記載の方法であって、ここで遺伝子型特徴が、総RNAまたは細胞質DNAが前記正常細胞中の濃度よりも前記サンプルにおいてより高い

濃度または低い濃度で存在するかどうかを決定する工程によって比較される、方法。

【発明の詳細な説明】

上皮細胞異常性の診断

発明の背景

1・発明の分野

本発明は、身体細胞の腫瘍および他の異常性の診断に関する。

2・関連技術の説明

特に、手術または治療を行った後にいかなる残りの疾患があるかどうかを特に決定するために、腫瘍の診断の改良された方法のための必要性がある。これは転移を検出するために特に必要である。本発明は、上皮腫瘍および上皮細胞の他の異常性に特に関する。本明細書で使用されるような用語「診断」は、腫瘍または他の異常性の存在または状態に関係する任意の種の情報を得ることを含み、そして予後を含む。

臨床的实施において、TNM（腫瘍結節転移）ステージングシステム、「悪性腫瘍のTNM分類」(UICC, Springer, Berlin(1992))、はなお、上皮腫瘍の場合における、最も良好な予後の情報を提供する。なぜならこれは診断時に腫瘍介入の程度を記載するからである。それにもかかわらず、このシステムは重大な限界を有する。なぜなら初期腫瘍段階にある何人かの患者は、たとえ腫瘍が局所的に再発しなくても、治療手術後に転移を発生させるためである。癌の進行段階にある他の患者は、手術後に無疾患状態にある。これらの腫瘍のための新規な診断マーカーが、明らかに必要とされる。

特には、結腸直腸癌(結腸または直腸の癌)において特に、ほんのわずかの診断マーカーしかない。原則として、さらなるマーカーは、遺伝子型または表現型の腫瘍細胞が、正常細胞と比較され得る場合利用可能になり得る。しかし、結腸直腸癌における比較研究の解釈は、サンプル間の変動および方法論的問題のために、これまでは失望するものであると分かっていた。例えば、腫瘍細胞株から得られたタンパク質フィンガープリントとヒト結腸陰窩から得られたものとの比較は、

臨床的な意味合いを有さないことが分かった (Jiら、Electrophoresis 15,391-4

05(1994)を参照のこと)。別の問題は、腸粘膜における生理学的に高い含量のプロテアーゼである。

発明の要旨

今や、上皮細胞が間質（結合組織）および他の不純物を実質的に含まない細胞性物質として単離されることを可能にする手順を使用して、適切な比較が、正常組織由来のサンプルの遺伝型または表現型と肺瘍組織または他の異常組織由来のサンプルの遺伝型または表現型との間で実施され得ることが見出されている。この細胞調製物は、正常細胞と異常細胞との間の差異が同定され、そしてタンパク質または核酸マップを作成するために使用されることを可能にするのに十分に純粋である。これらのマップは、結腸直腸癌のためのさらなるマーカーが見出されることを可能にする。さらに、手順は、種々のタイプの身体組織由来の上皮細胞で見出される他の種類の固体上皮腫瘍および他の異常性までにおよぶ一般的な適用性を有する。

従って、本発明は、疑わしい異常性の位置から採取した組織（特に患者（特にヒト患者）の腫瘍状の上皮細胞含有組織）のサンプルにおいて、上皮細胞における異常性（特に肺瘍）の診断方法を提供する。上皮細胞異常性を、疑わしい該異常性の位置から採取した組織のサンプルにおいて診断する方法であって、依然として存在するほとんどの他の組織から、上皮細胞に特異的なモノクローナル抗体と該組織とを反応させることによって上皮細胞から間質をサイズ分離する工程、抗体に結合した反応細胞を回収し、そして該抗体からそれらを放出させることによって上皮細胞を分離する工程、ここでサンプルが全組織の体積で少なくとも90%の上皮細胞を含み、そしてサンプルの少なくとも1つの表現型または遺伝子型の特徴を対応する正常上皮細胞と比較する工程を含む（からなるまたは含む）。好ましくは、精製したサンプルが、サンプルの全組織の体積で少なくとも90%の上皮細胞を含むことを決定するための基準は、細胞の膜透過後の抗サイトケラチン抗体を使用する蛍光活性化細胞選別法によってである。

上記の方法の使用によって、二次元ゲル電気泳動マップが、正常患者および結

腸直腸腫瘍保有患者の上皮から作成され、そして比較されてた。これは、特定の

タンパク質スポットが結腸直腸肺瘍細胞において過剰産生または過少産生されるという発見を得た。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の方法によって作成された、細胞調製物の正常な結腸直腸上皮細胞に存在するタンパク質の2Dゲルマップである。

好ましい実施態様の説明

本発明は結腸直腸腫瘍に主に関するが、上皮細胞を含む任意の他の固形腫瘍（例えば、特に肺腫瘍、乳房腫瘍、胃腫瘍、脾臓腫瘍、前立腺腫瘍および腎臓腫瘍）に利用可能である。さらに、それは例えば、直腸大腸炎、クローン病または憩室炎に関連するような、上皮細胞の他の異常を検出することに利用可能である。

高度の純粋な細胞調製物を形成するために十分に上皮細胞を分離するための本発明の最も好ましい手順は、組織を上皮細胞に特異的なモノクローナル抗体と反応させること、および反応した細胞を採集することを含む。このモノクローナル抗体は、適切な上皮細胞表面タンパク質（特にレセプター）と反応する任意の抗体であり得る。特に好ましいこのような抗体は、U. Latza, J. Clin. Pathol. 43, 213(1990)によって記載されるようなBer-EP4である。この抗体は、抗体でコーティングした磁気ビーズ（「Dynabead」）の形態で利用可能である。磁気ビーズは磁氣的に容易に分離され得るので、アッセイ技術における通例の方法においては、上皮細胞は磁氣的に採集され得、次いでビーズから洗浄され得る。

細胞を分離する別の方法は、同じリガンドまたは別のリガンド（例えば、上皮細胞レセプターに強力に結合する単一特異的な抗体またはペプチド）を使用して、非磁気性の不均質な方法によってなされる。リガンドは固相に結合され、これは、それ自身に結合するようになる上皮細胞を除去するために引き続き洗浄される。

好都合には、上皮細胞の調製物が、正常細胞と異常細胞との間の表現型の差異を決定するために使用される。これは、正常細胞においてよりも異常細胞においてより高い濃度または低い濃度で存在するという観点であり得る。この可能性は、

一方または他方のタンパク質の完全な不在を含む。

本発明は、これらの差異が遺伝的起源を有しようがまいが、そしてそれらが疾患の予後に関係していかなる価値を有しようがまいが、正常組織と異常組織との間の差異を示すためにそれ自体で、組織マッピングのために有用である。マッピングの2つの特に好ましい方法は、タンパク質マッピングおよび核酸マッピングである。タンパク質は、二次元ゲル電気泳動によって好都合にマップされ得る。スポットは、以下を含む方法によってサンプルのタンパク質抽出について実施される2D-PAGEへの参照によって定義される：

- (1) 5分間室温で10,000Gにて1000 μ lのタンパク質抽出物を遠心分離して、ペレットを形成し8M尿素、40% CHAPS、40mM Tris、65mMジチオエリスリトールおよび微量のプロモフェノールブルーを含む300 μ lの溶液中にペレットを溶解し、そして生じるサンプル溶液を、非線形の、S字型(S型)のpH勾配を有する固定化pH勾配(IPG)ポリアクリルアミドゲルの3mm幅×180mm長の小片へロードする；
- (2) 8M尿素、2% w/v CHAPS、10mMジチオエリスリトールおよびpH3.5~10の2% w/v緩衝液ならびに微量のプロモフェノールブルーの25mlの水溶液で一晩該ゲルを再水和させる；
- (3) 一次元電気泳動のためのIPGゲル小片上へ該サンプル溶液をロードし、そして3時間300から3500Vへ線形に増加される電圧で、次いでさらに3時間3500Vで、そして最後に17時間5000Vで電気泳動する；
- (4) 50mM Tris-HCl、pH6.8、6M尿素、30% w/vグリセロール、2% w/v SDS、2.5% w/vヨードアセトアミドおよび微量のプロモフェノールブルーを含むの100mlの水溶液で5分間IPGゲル小片を処理し、タンパク質を可溶化し、そしていずれの-S-S結合を還元する；
- (5) 9~16%のアクリルアミドモノマー、2.6%のジアクリロイルピペラジン架橋剤、5mMチオ硫酸ナトリウム、0.05%テトラメチルエチレンジアミン、0.1%過硫酸アンモニウムおよび0.375M Tris-HCl緩衝液(pH8.8) (すべての割合はw/vである)を含む水溶液からポリアクリルアミド勾配スラブゲル160×200×1.5mmを調製し、2時間第2級ブタノールで重層し、水とブタノールを交換し、そして15時間静置し、0.5%アガロース、pH8.3のTris-グリシン-SDS、25mM Tris、198mM

グリシンおよび0.1%SDSを含む、70℃まで加熱した水溶液でスラブゲルを重層し、そして二次元電気泳動のためにその上にIPGゲル小片をロードする；

(6) 一定の40mA/ゲルでおよび5時間10℃で二次元電気泳動を行う；そして

(7) ゲルを銀染色し、そしてレーザーデンスitomーターでそれらをスキャンし、染色されたゲルのコンピューター生成画像を提供する。

RNAは、細胞RNA（好ましくは、全細胞性または総細胞質性のmRNAはいくつかのサンプルから抽出することは非常に難しい）を増幅し、そして得られた増幅核酸（好都合にはDNAとして）を特徴的なバンドパターン（いわゆるフィンガープリント）を提供するためにゲル上で電気泳動することによってマッピングされ得る。最も好ましくは、2つのマップが、腫瘍細胞で過剰産生されるまたは過少産生され、そしてRNA産生の増加または減少が付随するタンパク質についての探求において、相関付けられる。

好ましくは、本発明は、組織の起源に従って、種々の種類のガンについての有力な新しいマーカーを検出するおよび試験するために使用される。一旦マーカーがこのように検出されると、サンプル調製の工程のいくらかを除去すること、およびマーカーについての肺瘍組織および正常組織を単に比較することが十分可能となり得る。しかし、これが可能であるかどうかは個々のマーカーに依存する。

マーカーは、二次元ゲル電気泳動、タンパク質に対する抗体を用いるウェスタンブロッティング、一次元ゲル電気泳動とウェスタンブロットとの組み合わせ、免疫アッセイ（特に、酵素連結増強化学発光アッセイ）を含む、任意の従来の手段によってタンパク質として検出可能であり得る。

患者由来のサンプル中のマーカーの存在または量のためのアッセイの方法は、ゲル電気泳動法もしくは免疫学的方法またはこの2つのある組み合わせを含む（からなるまたは含む）。好都合には、試験する方法は、全体的にまたは大部分的に免疫学的方法である（すなわち、代表的に、それは本発明のタンパク質とそれに対する抗体との間の相互作用または本発明の抗体と別の抗体との間の相互作用を含む）。免疫学的方法は、好ましくは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)またはウェスタンブロット（また免疫プロットとも称される）を含む。

免疫学的アッセイのために、抗体が要求される。抗体を得るために、マーカー

スポットの少なくとも1つのタンパク質または同じ特異的エピトープを有することに関してそれと十分に免疫学的に類似のタンパク質を精製および同定することがまず必要である。タンパク質は、標準的な方法によって精製され得る。従って、スポットは2D-ゲルから切り出され（または溶液中に電気溶出されるかまたは膜へ電気的に転写されそして膜から切り出される）そして、公知の方法によって脱色される。

精製されたタンパク質は、次いでエドマン分解によるN末端配列決定を含む任意の周知の方法のいずれかによって配列決定され得る（または、タンパク質のN末端がブロックされる場合、CNBrによってかまたはペプチダーゼによる消化によって切断されたフラグメントへ適用される）。質量分光測定はまた、配列決定のために使用され得る（特に、M. Wilms, Nature 379, 466-469(1996)（本開示は、本明細書中で参考として援用される）の方法）。タンパク質が配列決定された後、これは他の公知のタンパク質との類似性について配列データベースにおいてチェックされ得る。タンパク質がすでに公知であるかまたはすでに公知のタンパク質と非常に類似する場合、抗体はおそらく市販されている。さもなければ、抗体はマーカータンパク質のアッセイの免疫学的方法の目的のために惹起させなければならない。

精製されたタンパク質が、抗体を惹起するために直接使用され得るか、または合成タンパク質またはそのペプチドは、プローブまたはプライマーとして標識された縮重オリゴのプールを使用して、組換えDNA手段によって作製され得る。

タンパク質の全アミノ酸配列の知識によって、その種々のペプチドまたは全長のタンパク質でさえも、ペプチド合成の通例の方法によって合成され得る。そのペプチドは、全長タンパク質に対して惹起されたポリクローナル抗体との反応について試験され得る。反応を提供するこれらのペプチドは次いで、合成され得、そして抗体を惹起させるための全長タンパク質の代わりにまたはサンプル中に存在するタンパク質のための競合アッセイまたは置換アッセイにおいて使用され得る。

本明細書中で使用される用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fabのような抗体のフラグメントおよび遺伝的に操作される抗体を含む。

抗体は、キメラ抗体または単一種の抗体であり得る。

最初に惹起された抗体は、ポリクローナルであり得るが、モノクローナル抗体は、周知のKöhler-Milsteinの方法を使用して調製され得る。好都合には、マウス・マウスハイブリドーマ由来の腹水が使用され、調製用ゲルから切り出されたスポットから精製されたタンパク質に対してスクリーニングされる。

抗体はまた、バクテリオファージの表面において免疫グロブリン遺伝子を発現させ、そして特異的抗原(すなわち本発明のマーカータンパク質)に対して得られたクローンのスクリーニングによって惹起され得る。例えば、S.L.Morrison [Molecular Biology and Biotechnology] Robert A Meyers編、VCH Publishers Inc. 1995, 37頁(本開示は、本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

ウエスタンブロットのためのプロトコルは周知である。電気泳動ゲル(これは1D-ゲルまたは2Dゲルであり得る)から適切な膜(好ましくは、ニトロセルロースまたはポリビニリデンジフルオライド)へのタンパク質の移動後、膜は、免疫学的試薬の非特異的吸着を阻止するためにブロックされる。代表的なブロック溶液は、脱脂粉乳またはウシ血清アルブミンの溶液である。ブロッキング後、タンパク質は直接的または間接的に検出され得る。直接的検出は標識化一次抗体を使用するが、間接的検出において二次抗体が一次抗体に対して惹起され、そして二次抗体が標識化される。抗体は通常、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼのような酵素、またはストレプトアビジンおよびアビジンと高度な親和性を有するビオチンのような共通リガンドに高度な親和性を有するリガンドで標識される。次いでタンパク質は、高親和性リガンド型の標識が使用される場合、酵素標識、または酵素標識化共通リガンドおよび酵素のための基質を読み取るために、酵素基質(好都合には、発色物)を付加することによって検出される。

タンパク質の存在を定量または検出する代替方法は、上皮細胞サンプルについて、または1Dまたは2D電気泳動により単離または部分的に単離され、プロッティ

ングにより膜に移されたタンパク質について行なわれ得る、免疫アッセイ、好ましくはELISAの使用である。本発明において有用な免疫アッセイの型は、抗体捕捉アッセイ、抗原捕捉アッセイ（競合または置換アッセイとも呼ばれる）、および2抗体サンドイッチ免疫アッセイを含む。全ての免疫アッセイは、検出または

定量のための、標識されたマーカートンパク質、抗体、または二次試薬を必要とする。ウェスタンブロッティングのための上記の標識が用いられ得る。標識は、発色、蛍光、または化学発光手段を使用して、例えば、ELISAにおいて任意の従来の方法により「読み出され」または検出され得る。増強された化学発光アッセイが特に好ましく、そしてこのようなアッセイのためのいくつかの市販のキットが、ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼ酵素標識に関連して公知である。

上記の形態および他の形態のアッセイに適切な試験キットは、当業者に明らかである。好ましいこのようなキットは、抗体捕捉アッセイのためのキットであり、そして別々に、または連結した二重抗体の形態のいずれかで提供される、タンパク質マーカーに対する第一の抗体、およびそれに対する標識された第二の抗体を含む。試験キットは、必要に応じて、任意の種々の支持体または固相（特に、プラスチックチューブおよびマイクロタイタープレート）を含み得る。このような支持体への抗原または抗体の結合を補助する手順は、周知である。

不均質アッセイは安価であり、当該分野で十分に理解されているが、均質アッセイもまた、本発明において用いられ得る。

免疫PCRは、上記の免疫アッセイのシグナルを増幅する方法として用いられ得る。この技術では、抗体が、PCRプライマーを含む任意のDNAの断片に共有結合しており、それにより、抗体が付着したDNAはPCRにより増幅される。その開示が本明細書中に参考として援用される、Hendricksonら、Nuc1. Acids Res. 23, 522-529(1995)を参照のこと。

もちろん、マーカートンパク質を、少なくとも一次元ゲル電気泳動を含む方法によりアッセイすることは可能である。ゲル電気泳動プロトコルは、本明細書中に記載されるプロトコルに対する限定であるとはみなされない。これらは、相当

変化し得る。サンプルは、最初に、例えば、高モル濃度の尿素、界面活性剤、およびジチオスレイトール、またはジチオエリスリトールを用いて破壊され、 $-S-S-$ 結合が切断される。次いで、第一の次元のゲルを、ゲルを通してpH勾配を確立する両性電解質混合物中で泳動し、その結果、タンパク質はそれらの等電点（すなわち、両性電解質により確立されたpH勾配内のゲルのpHが、タンパク質の荷電

に等しい点）に移動する。この段階で、組織の異常についての適切な試験を提供する、他のスポットからのマーカースポットの十分な分解能が存在し得る。そうでない場合、本発明のタンパク質に対する抗体を用いる、ウェスタンブロットまたは免疫アッセイが行なわれ得る。あるいは、次いで、第二の次元の電気泳動が行なわれ得る。ここで、第一の次元のゲルが、電流の方向に直交して第二のゲル上にロードされる。これは、通常、SDS-PAGEゲルであり、その原理は、タンパク質上の荷電がSDSの効果により圧倒され、その結果、ゲルは、タンパク質を、分子量に従って分離することである。これは、より高いアクリルアミド濃度により補助される。

異常な遺伝子型は、好ましくは、サンプルに対するプローブの結合のストリンジエンシーを増加させるように、タンパク質をコードするDNAにおける2つの部位で、細胞RNAを検出する（特に、RNAに特異的な標識DNAでプローブする）任意の従来の手段により、RNAとして検出され得る。例えば、17~40のヌクレオチド長の標識オリゴヌクレオチドは、この目的のために有用である。好ましくは、サンプルから抽出されたRNAは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応により、このアッセイを行う前に増幅される。サンプルRNAは通常、とにかく増幅されるべきであるので、標識増幅手順（例えば、標識プライマーを用いるPCR）を用いることがより便利であり得る。これに関連して、疾患状態の遺伝子型が未知である場合、ランダムな任意のプライマーが非常に有用であり得ることが見出されている。

以下の実施例は、本発明を例示する。

実施例 1

材料および方法

ヒト結腸陰窩の単離

種々の医学的な理由のためにヒト腸の切除手術後すぐに、外科的標本を氷上で保管した。氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 溶液で洗った後、粘膜の断片 (5×5 cm) を組織の健常部分から、切開した (罹患部位から可能な限り遠くから取り出した)。次いで、粘膜を 3 mM の EDTA および同時調製したプロテアーゼインヒビターのカクテル (50μ g/ml ロイペプチン、 0.2 mM PMSF、および 0.8 mM

ベンズアミジン) を含む氷冷した PBS 溶液に浸した。陰窩を基底膜からメスで掻き出し、次いで、 300μ m の孔径を有するスチールメッシュを通して穏やかに押し出し、間質から上皮細胞を分離した。次いで、このようにして得られた細胞懸濁液を 200μ m の孔径を有するナイロンメッシュを通して濾過した。これは、単一のクラスターもしくは小さなクラスター、または上皮細胞および他の細胞 (リンパ球、マクロファージなど) の単離を可能にした。間質 (結合組織) は、この機械的な手順により変質されず、そして理論上にさらなる分析に使用され得た。

上皮細胞の単離

細胞を洗い、そして 10 分間 4°C にて $350 \times g$ で遠心分離した後、細胞を上記の溶液に、 2×10^7 細胞/ml の濃度で再懸濁した。次いで、この懸濁物を、製造業者 (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, Germany) の指示に従い、Ber-EP4 抗体でコートした抗上皮細胞「Dynabeads」とともに 30 分間 4°C にてインキュベートした。次いで、細胞を磁性粒子コンセンレーター (MPC-1, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, Germany) を用いて収集し、そして 5 回洗浄した。細胞の計数および生存率の確認をトリパンプルーを使用して行い、そして 90% を超える生存細胞を示した。この最初の部分の手順に必要とされる時間は、わずか 90 分である。

コントロール

製造業者の指示に従って、調製産物をフルオレセイン結合抗サイトケラチン抗体 (CAM 5.2, Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA) を用いて 45 分間標識した後に、細胞サンプルの性質を評価した。次いで、サンプルを蛍光活性化セルソーター (Epics, Coulter-Immunotech, Hamburg, Germany) を用いて、定性的に選別した。このようにして、サンプルが、この段階での全組織サンプルの容量に対して少なくとも 90% の上皮細胞を含むと推定した。

変性

遠心分離の後、ペレットをSWISS-2DPAGEプロトコル (Sanchezら、Electrophoresis 16, 1131-1151(1995)) に従って、8M尿素、CHAPS (4% w/v)、Tris (40mM)、およびDTE (65mM) を用いて変性させ、そして-20℃で保存した。

分析的2-D PAGE

各サンプルの総タンパク質を、周知のBradford法により記載されるようにアッ

セイした。100 μ gの正常ヒト結腸上皮細胞のタンパク質サンプルを、2-D PAGEにより分離した。pHが3.5~10.0の範囲の市販のシグモイド固定化pH勾配 (IPG) (18cm) を第一の次元に使用した。平衡化の後、IPGゲルの小片を、第二の次元のための、垂直方向の勾配のスラブゲル (9~16%アクリルアミド) に移し、そしてLaemmli-SDS-非連続 (discontinuous) 系で泳動した。使用したクロスリンカーは、ピペラジンジアクリルイル (piperazine diacrylyl) (PDA 2.6%)、および補助的な触媒であるチオ硫酸ナトリウム (5mM) であった。この方法の全ての記載を、上記の発明の要旨に示す。

分取2-D PAGE

3mgの正常タンパク質のサンプルを2-D PAGEにより分離し、そしてPVDFメンブレンに電氣的に移した。pHが3.5~10.0の範囲の市販の固定化pH勾配 (IPG) を第一の次元の分離のために使用した。ゲル内において、サンプルの再水和を用い、これは、より多いサンプルのローディングを可能にし、分解能を上昇させ、そして泳動時間を短縮した。平衡化の後、IPGゲル小片を第二の次元のための垂直方向の勾配のスラブゲル (9~16%アクリルアミド) に移した。次いで、PVDFメンブレンへの電氣的プロットティング (electroblotting) を、緩衝剤として10%メタノールおよび10mM CAPS (pH11) を備える、手作りの半乾燥 (semi-dry) 装置を用いて2時間200Vで行った。メンブレンをアミドブラックで染色した。

タンパク質の同定

ゲルマッチング (gel matching)

レーザーデンシトメータスキャンの後に、2-D PAGE画像分析を、MELANIE IIソフトウェアパッケージ (Bio-Rad, CA) を使用して行った。タンパク質のスポ

ットを検出し、そして自動的に定量した。光学密度、面積および容量が計算され、これらはタンパク質濃度に直接相関していた。相対光学密度および相対容量もまた計算され、ゲルの充填および染色における相違を補正した。スポットの実験的なpIおよびMW、ならびにタンパク質の同定をMELANIE II画像分析ソフトウェア (Bio-Rad, Hercules, California, USA) により、上記で言及した肝臓のSWISS-2DPAGE参照マップ (Scanchezら、(1995) から推定した。

微量配列決定

PVDFメンブレンをアミドブラックで染色し、水で脱染し、そして乾燥した。目的のスポットを切り出し、窒素下で乾燥し、そして微量配列決定を行うまでEppendorfチューブ中で-20℃に保った。それぞれのスポットについて、10~15回のエドマン分解のサイクルを行い、そして既知のタンパク質との同一性を確立するために、SWISS-PROTデータベース (Bairochら、Nucleic Acids Res. 22, 3578-3580(1994)を参照のこと) を検索した。

免疫ブロッティング

PVDFメンブレンへの電気泳動的トランスファーの後、後者を一次抗体とのインキュベートの前に、10mM Tris-HCl (pH7.0)、500mM NaCl、0.05% Tween-20、および0.5%脱脂粉乳でブロッキングした。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗ウサギ抗体および抗マウス抗体を、二次抗体として1/1000希釈で使用した。プロットをBoehringer Mannheimにより記載されるような増強された化学発光およびX線フィルムを用いて発色させた。抗TCTPモノクローナル抗体は、コントロールおよび参照マップとの比較のための内部マーカーとして使用した。

(5) 結果

上記のサイズ分離および「Ber-EP4」コートした「Dynabeads」を用いた磁性分離は、サンプルを95%を超える上皮細胞まで濃縮することを可能にした。この純粋な状態を、フルオレセイン結合抗サイトケラチン抗体を用いる第2の連続的染色、次いで蛍光活性化細胞選別により評価した。走査型電子顕微鏡を用いた品質のコントロールは、細胞表面の変性を示さなかった。血清アルブミンにより評価した場合、血液の混入は、洗浄および濃縮の後では低かった。「Dynabeads」を

用いた分離の前と後でのサンプルの比較は、分解パターンの対比の改善および消失を示した。銀染色を用いて、ゲルあたり、平均900~1200の数のスポットを得た。

40個のタンパク質に関連するスポットを配列決定し、表1において列挙したように同定した。正常な結腸上皮細胞のタンパク質の基本地図を定義した(図1)。図1に対する鍵は、以下の表に提供され、この表では、全てのpIおよび分子量の値が明らかである(絶対値ではない)。免疫プロットティングを用いて、組織異常(例えば、結腸直腸ガン)において可能な診断または予後の差異を有するタンパク

質の発現を評価した。特に、タンパク質ファミリーCD44、Mn-SOD、EGF-レセプター、PAI-1、hsp70、およびPMS2が位置決めされた。

組織細胞異常の診断または予後における上記のタンパク質の関連に関する参考文献の例は、以下の通りである：

EGFR: R. Seshadri et al., Int. J. Cancer, 69, 23-27 (1996)

CD44: L. H. Finkle et al., The Lancet, 345, 583 (1995); J. Mulder, The Lancet 344, 1470-1472 (1994); Z. Nihel et al., Surgery Today, 26, 760-761 (1996)

PMS2: B. Liu et al., Nature Medicine, 2, 169-174 (1996)

MnSOD: A.M.L. Janssen et al., Abstract No. 1327, Proceedings of the 18th Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington D.C., April 20-24, 1996, 37, 194-195 (1996);

I. Katsumi et al., JICST Abstract Accession No. 97A0705439 (1997);

HSP-70: J. Stulik et al., Electrophoresis 18 (3-4), 625-628 (1997).

類似の研究が、腫瘍組織の切断片に対して実施されて、腫瘍組織において過剰発現または過少発現 (under-express) するタンパク質を示すスポットを生じるゲルを生じ得る。特に、MELANIE IIソフトウェアを用いる、地図の比較は、診断または予後に差異のあるタンパク質が同定されるのを可能にする。例は、1998年

3月23日にUK受理官庁に出願されたElectrophoretics International plcらの同時係属中のPCT特許出願（同じ優先権を主張し、そして「Diagnosis of Colorectal Cancer and Proteins and Antibodies for Use Therein」と題され、その開示は本明細書中に参考として援用される）において与えられる。

上皮細胞中でサンプルを富化するためのサンプル調製は、間質（細胞間結合組織）が異なる組織において異なっている場合でさえ、再現性のあるパターンが得られ得るという利点を有する。この様にして、サンプルから血液、糞便材料、リンパ球などがはずされる。

省略名	タンパク質の説明	見かけのpI	見かけのMW
GRP75	ミトコンドリアストレス70タンパク質前駆体	5.40	73173
GRP75	ミトコンドリアストレス70タンパク質前駆体	5.32	73173
ER60	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼER-60前駆体	5.49	52703
ER60	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼER-60前駆体	5.70	52377
ER60	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼER-60前駆体	5.58	52485
PIHDB	ピルビン酸デヒドロゲナーゼE1成分、βサブユニット前駆体	5.38	34062
CTSD	カテプシンD前駆体	5.56	27960
CTSD	カテプシンD前駆体	5.39	27220
KCY	可能なシチオリレート (cytiolyle) キナーゼ	5.42	21346
RPL12	60Sリボソームタンパク質L12	5.31	11038
ATPM	ATPシンターゼ共役因子6、ミトコンドリア前駆体	5.31	11038
H38	ヘモグロビンβ鎖	6.24	10204
HSPD1	ミトコンドリア基質タンパク質PI前駆体	5.05	56668
HSPD1	ミトコンドリア基質タンパク質PI前駆体	5.16	56084
HSPD1	ミトコンドリア基質タンパク質PI前駆体	5.09	56200
ER31	小胞体タンパク質ERP31前駆体	6.13	26432

省略名	タンパク質の説明	見かけのpI	見かけのMW
ECFM	エノイルCoAヒドラーゼ、ミトコンドリア前駆体	5.95	25594
NDUFV2	NADH-ユビキノンデヒドロゲナーゼ24KDサブユニット前駆体	5.85	23060
MER 5	MER5タンパク質 (フラグメント)	6.07	22824
MRPL12	ミトコンドリア60Sリボソームタンパク質L7/L12前駆体	5.01	17462
HBB	ヘモグロビン β 鎖	6.44	11163
B2M	β -2-ミクログロブリン前駆体	6.40	11038
CALR	カルレテイクユリン前駆体	4.41	98700
ATP5B	ATPシンターゼ β 鎖、ミトコンドリア前駆体	4.93	49118
ACTB	アクチン、細胞質1 (β アクチン)	5.05	41396
ACTB	アクチン、細胞質1 (β アクチン)	5.11	41497
SPTB1	スペクトリン β 鎖	5.60	24976
MYL1	ミオシン軽鎖	5.06	20750
ATP5D	ATPシンターゼ δ 鎖、ミトコンドリア前駆体	4.50	13360
COX5A	シトクロムCオキシダーゼポリペプチドVA前駆体	4.80	12166
TXN	チオレドキシン (ATL由来因子)	4.84	11163
BOD1	スーパーオキシドジスムターゼ (Cu-Zn)	5.42	16331

省略名	タンパク質の説明	見かけのpI	見かけのMW
SOD1	スーパーオキシドジスムターゼ (Cu-Zn)	5.70	16248
GAL61	ガレクチン1	4.93	12076
COX5B	シトクロムCオキシダーゼポリペプチドVB前駆体	5.62	12121
SOD2	スーパーオキシドジスムターゼ (Mn)	7.36	21182
SOD2	スーパーオキシドジスムターゼ (Mn)	7.78	21182
NUPM	NADH-ユビキノンオキシドレダクターゼ19KDサブユニット	8.52	16884
CRYAB	α クリスタリンB鎖	8.52	16884
HBA1	ヘモグロビン α 鎖	9.44	11331
GSTP1	グルタチオンSトランスフェラーゼP	5.46	22765
TPI1	トリオースリン酸イソメラーゼ	6.38	25826
CD44	細胞外マトリックスレセプターIII	5.06	43465
EF1B	延長因子1 β	4.54	30228
GLUD1	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ1前駆体	7.26	52813
GLUD1	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ1前駆体	6.50	52813
GLUD1	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ1前駆体	6.91	52703
CAT	カタラーゼ	6.50	57735

省略名	タンパク質の説明	見かけのpI	見かけのMW
CAT	カタラーゼ	6.74	57735
CAT	カタラーゼ	7.07	57615
TCTP	転写制御される腫瘍タンパク質	4.79	21302
EGFR	上皮増殖因子レセプター	5.75	141900
PAI-1	プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1	6.50	46534
PM92	DNAミスマッチ修復タンパク質	6.39	51925
U1A6	未知	6.2	25000

実施例 2

サンプル

サンプルを、腫瘍性ヒト結腸直腸組織および正常ヒト結腸直腸組織から採取した。この結腸直腸組織からの上皮細胞を、実施例 1 に記載の通りに、磁性粒子（

「DynaBeads」)を用いて単離した。

RNA抽出

総細胞RNAを、ChomczynskyおよびSacchi, *Analytical Biochemistry* 162, 156-159(1987)のチオシアン酸グアニジン-フェノール-クロロホルム抽出法により抽出した。要約すると、この手順は以下の通りであった。氷上でミンチおよびホモジネートした組織に対して、2-メルカプトエタノールを含有する4Mチオシアン酸グアニジン溶液を添加し、次いで酢酸ナトリウム (pH4)、フェノール、およびクロロホルムを添加した。徹底的に混合し、そして遠心分離した後、RNAを含有する水相を取り出し、そしてイソプロパノールまたはエタノールを用いてRNAを沈殿させた。遠心分離後、RNAペレットをエタノールで洗浄し、そしてSDS中に溶解させた。

総細胞質RNAを、Aubelら, 「*Current Protocols in Molecular Biology*」 (1981), Unit 4.1, 「*Preparation of Cytoplasmic RNA from Tissue Culture Cells*」に記載される通りに抽出した。要約すると、この手順は以下の通りである。細胞を、氷冷リン酸緩衝化生理食塩水を用いて洗浄し、そして続く全ての操作について氷上に保持した。ペレットまたは回収された細胞を、非イオン性界面活性剤「Nonidet」P-40を含有する溶解緩衝液中に再懸濁した。原形質膜の溶解は、ほぼ直ぐに生じる。インタクトな核を、短時間の微量遠心機でのスピンのにより除去し、そしてドデシル硫酸ナトリウムを細胞質上清に添加してタンパク質を変性させた。タンパク質および脂質を、フェノール/クロロホルムおよびクロロホルムを用いる抽出により除去した。いくつかの場合には、抽出前に、細胞質抽出物をプロテアーゼを用いて処理することが必要であった。細胞質RNAを、エタノール沈殿により回収し、そして260nmおよび280nmの吸光度を測定することにより定量した。

プライマー選択

任意のオリゴヌクレオチド (DNA) プライマーを用いた。これらは、まだ最適化されていないが、通常は17~40ヌクレオチドを有する。

アッセイ条件

一般的な方法は以下の通りである。全てのRNAを、任意のプライマーを用いてcDNAに逆転写し、その後、PCRを以前の反応の産物からの同じプライマーを用いて、低ストリンジェンシーのアニーリング温度にて5サイクルおよび高ストリンジェンシー温度にて35サイクルで行った。これらは全て、産物を配列決定型ゲルにおいて分離し得るように、放射性ヌクレオチドの存在下で行った。

より詳細には、各逆転写反応 (RT) を、 $20\mu\text{l}$ の最終容量において、50ngの総RNA、50mM Tris-HCl (pH8.3)、75mM KCl、3mM MgCl_2 、10mM DTT、0.5mMの各dNTP、 $0.5\mu\text{M}$ プライマー、20u RNaseインヒビター、および200u逆転写酵素 (Gibco BRL) を用いて行った。酵素とのインキュベーションを 37°C にて1時間行い、そして反応液を 95°C にて5分間加熱することにより反応を停止させた。

次にPCRを、 $25\mu\text{l}$ の最終容量中、 $2\mu\text{l}$ のRT産物、10mM Tris-HCl、2.5mM MgCl_2 、50mM KCl、0.1mg/mlゼラチン、0.1mMの各dNTP、 $2\mu\text{M}$ プライマー、1.25u Taqポリメラーゼ (Boehringer Mannheim) 、および $2\mu\text{Ci}$ [$\alpha\text{-}^{33}\text{P}$]-dATPを用いて行った。反応は、開始変性工程 (94°C にて1分間)、低ストリンジェンシー条件 (94°C にて1分間；アニーリング温度にて45秒間； 72°C にて1分30秒間) を5サイクル、高ストリンジェンシー条件 (94°C にて1分間； 60°C にて45秒間； 72°C にて1分間) を35サイクル、および最終伸長 (72°C にて5分間) からなっていた。全ての反応を、Programmable Thermal Controller-100 (MJ Research Inc.) において行った。

PCR産物を、95%脱イオンホルムアミド変性ローディング緩衝液 (DLB) を用いて希釈 (1/4) し、 95°C にて3分間加熱し、そして直ぐに氷上で冷却した。各希釈サンプル $2\mu\text{l}$ を、6%ポリアクリルアミド/8M尿素変性配列決定ゲル (長さ40cm、幅30cm、厚さ0.4mm) 中でロードし、そして55Wにて3~4時間泳動した。ゲルを、減圧下で 80°C にて乾燥させ、そして増感スクリーンを用いずに室温にて1~3日間、X線フィルムに曝露した。次いで、正常組織サンプルおよび異常組織サンプルからのゲルから示される「フィンガープリント」を比較した。

DNAをゲルのバンドから切り出し、そして配列決定した。次いで、これにより2Dゲルに現れるタンパク質が予測されるか否かを決定し得る。

【図1】

結腸直腸上皮細胞 2-D PAGE
参照マップ

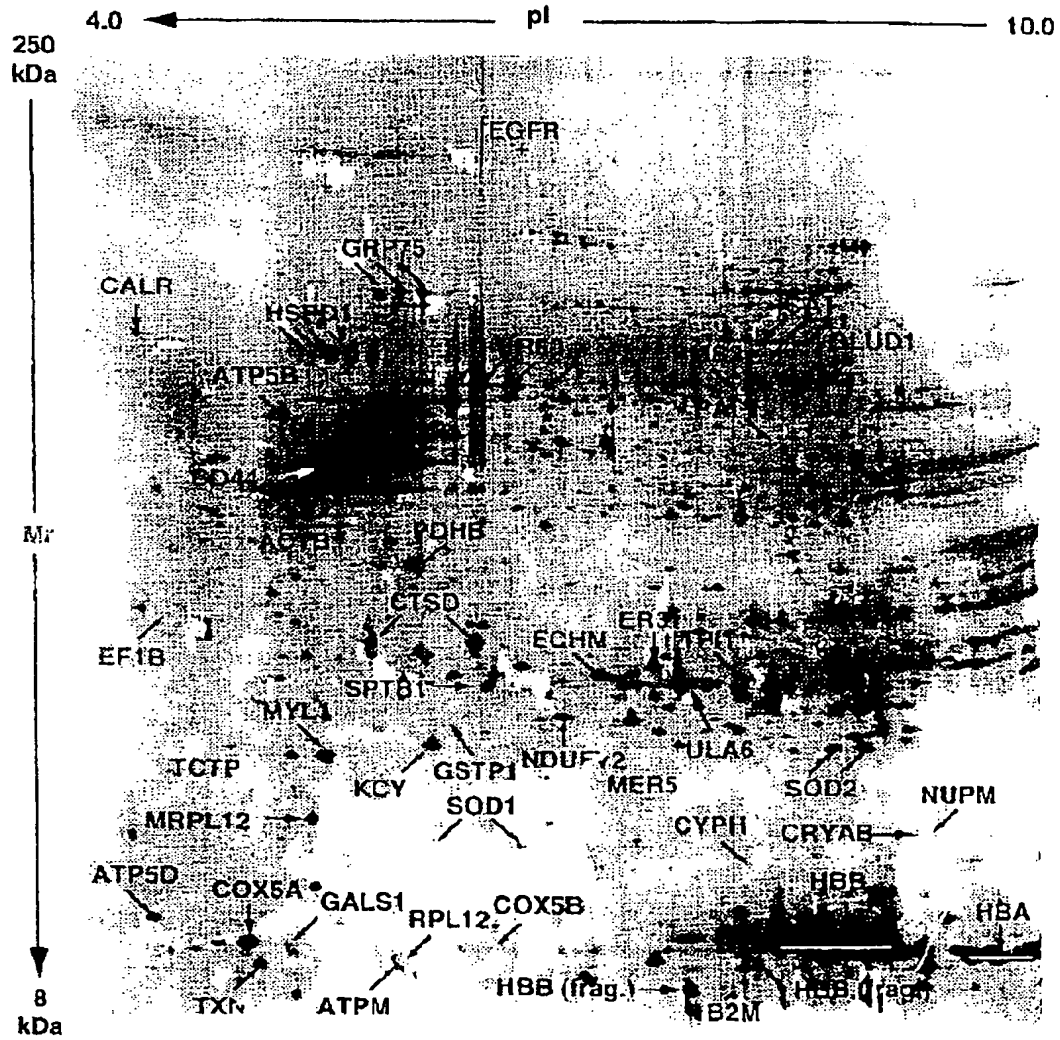


Fig 1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 98/00881

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/574 C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	REYMOND ET AL: "Standardized characterization of gene expression in human colorectal epithelium by two-dimensional electrophoresis" ELECTROPHORESIS, vol. 18, no. 5, December 1997, pages 2842-2848, XP002071492 see the whole document	1-7
X	REYMOND M A ET AL: "Specific sample preparation in colorectal cancer." ELECTROPHORESIS, vol. 18, no. 3-4, - 1997 pages 622-624, XP002072104 see the whole document	1-7

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 July 1998

Date of mailing of the international search report

05/08/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tr. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Routledge, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 98/00881

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	WO 97 37226 A (MAYO FOUNDATION ; ROCHE PATRICK C (US); KLEE GEORGE G (US); LIMBURG) 9 October 1997 see claims 1-3,5,7-9,11,12 see page 2, line 35 - page 3, line 21 see page 4, line 27 - line 32 see page 11, line 9 - line 15 see examples 2-5 ---	1-7
Y	US 5 547 928 A (WU YING-JYE ET AL) 20 August 1996 see column 7, line 43 - line 60 see column 11, line 35 - line 38 see column 11, line 62 - column 14, line 56 ---	1-7
Y	WO 97 09600 A (MEDICAL RES COUNCIL ; NEILL IAN KENNETH O (GB); LOKTIONOV ALEXANDRE) 13 March 1997 see claims 1,10-14,17,18 see page 10, line 4 - page 12, line 27 see page 13, line 9 - line 19 -----	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 98/00881

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9737226	A	09-10-1997	AU	2597397 A	22-10-1997
US 5547928	A	20-08-1996	AU	1437895 A	03-07-1995
			WO	9516919 A	22-06-1995
WO 9709600	A	13-03-1997	AU	6883096 A	27-03-1997

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード (参考)
// C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 レイモンド, マーク アンドレ
 スイス国 シーエイチ 1222 ベセナツ,
 シェミン デス コ布林ス 3

(72)発明者 ベイナド, ミグエル エンジェル
 スペイン国 イー08907 ル ホスピタレ
 ット, オートビア カステルデフェルス
 2. 7, インスティチュート デ レセル
 カ オンコロギカ